



TITLE:

# Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Kuriki, Mao

---

CITATION:

Kuriki, Mao. Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22646>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-03-25に公開; \*Mao Kuriki, 1 \*Fuminori Sato, 1 Hiroyuki Arai, 1 Maina Sogabe, 1 Mari Kaneko, 2 Hiroshi Kiyonari, 2 Koichi Kawakami, 3 Yuki Yoshimoto, 4 5 Chisa Shukunami, 4 5 Atsuko Sehara-Fujisawa1:Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification. Development 2020. 正式な巻及び項数は未定である。

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	栗木 麻央
論文題目	Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification （胸骨の骨化は限定的な発生ステージ・細胞系譜において転写因子 Ebf3 を必要とする）		
（論文内容の要旨）			
<p>生体の運動器は筋肉と骨、そしてそれらを接続・保持する腱や結合組織から成り立つ。結合組織中の線維芽細胞、骨芽細胞の発生・分化機構は未解明なところが多い。近年、運動器形成において、結合組織を構成する線維芽細胞集団が、筋組織の走行や接着に重要な役割を持つことが明らかにされつつあるが、これらの細胞集団の系譜や骨形成における役割や分子機構については、更なる理解が求められている。</p> <p>本論文では、早期発生ステージにおいて腱・結合組織で発現する転写因子 early B cell factor 3 (Ebf3)が、胸骨の骨化に関与することを明らかにした。</p> <p>GAL4/UAS エンハンサートラップにより、ゼブラフィッシュ胚の腱・結合組織で発現する遺伝子のひとつとして Ebf3 が同定された。Ebf3 の腱・結合組織における発現は、マウス胚においても確認されたことから、Ebf3<sup>flox/flox</sup>マウスを作製し、運動器発生における Ebf3 の役割を検討した。Ebf3 は、発生初期 (E10.5)の間葉組織で発現を開始する。中胚葉に分類される間葉組織の発生起源には、体節と側板中胚葉(LPM)の2つがある。体節からは、椎骨や肋骨を含む体幹の組織が、LPM からは、四肢の骨や頭蓋の一部、そして胸骨が発生する。他のファミリー遺伝子(Ebf1,Ebf2,Ebf4)とその発現を比較した結果、胸骨と周辺結合組織の起源となる胸部 LPM では、Ebf 3 のみが発現していた。そこで、このような Ebf3 の特徴的な発現パターンから、胸部の筋骨格系形成における Ebf3 の役割に注目して解析を行った。</p> <p>全身(CAG-Cre)Ebf3 ノックアウト(KO)マウスの胸部では、体節由来の椎骨と肋骨が正常に形成されたのに対し、胸部 LPM 由来の胸骨で骨化の遅延が確認された。この胸骨の表現型は、LPM 特異的(Prx1-Cre) Ebf3 ノックアウト(KO)マウスにおいて再現され、LPM 組織において発現する Ebf3 が、自律的かつ胸骨特異的に、その骨化に機能することが示された。</p> <p>LPM 特異的 Ebf3 KO マウスの胸部 LPM では、既に胸骨形成前のステージ（ E12.5 前後）で、Runx2+骨芽前駆細胞の減少が見られ、Ebf3 が LPM 間葉細胞からの Runx2+骨芽前駆細胞の産生という、早期の骨芽細胞系譜の分化を制御していることが示唆された。さらに、タモキシフェン誘導性 (Ubc-CreERT<sup>2</sup>)時期特異的 Ebf3 KO マウスの表現型評価により、Ebf3 の骨芽細胞系譜での機能時期が、E10.5 前後であることを特定した。この時期は、Ebf3 が間葉組織で発現を開始し、胸部 LPM で独占的な発現を示す時期と一致する。</p> <p>そこで、LPM における Runx2+骨芽前駆細胞の産生機構を探るため、LPM 特異的 Ebf3 KO 胚と Control 胚（ヘテロ胚）それぞれから、E10.5 胚の胸部 LPM 組織をフローサイトメトリーで採集し、RNA-seq 解析による遺伝子発現比較を行った。その結果、KO サンプルでは、Runx2 の上流制御因子として報告されている Shox2 の発現低下と、未分化線維芽細胞マーカー(Egr1/2,Osr1)の発現上昇が見られた。また種々の細胞分化に関わる転写因子 Islet1 の発現上昇が見られ、Ebf3KO E10.5 胚の LPM では Islet1 陽性細胞が増加することも確認された。これらの解析から、Ebf3 が LPM 間葉細胞からの線維芽前駆細胞と骨芽前駆細胞の産生において、線維芽細胞分化を抑制し、骨芽前駆細胞の分化を促進することが示唆された。</p> <p>これらの結果により本研究は、発生学上あるいは進化上、興味深い位置付けにある胸骨発生における Ebf3 の役割を明らかにすると同時に、未解明なところの多い発生過程における骨芽細胞分化の新たな分子・細胞機構を示唆した。</p>			

（論文審査の結果の要旨）			
骨や骨格筋からなる運動器は多様な間質細胞を含むが、それらの細胞の系譜や起源、発生における役割については未解明なところが多い。本研究では、エンハンサートラップによりゼブラフィッシュ胚の腱・結合組織で高発現する転写因子として同定した early B cell factor 3 (Ebf3) が、マウス胚で同様の発現パターンを示すことを見出したことから、マウスを用いて運動器発生における Ebf3 の役割を調べた。全身 Ebf3 欠損 (KO) マウスでは、沿軸中胚葉 (体節) 由来の椎骨・肋骨の正常な形成に対し、側板中胚葉 (LPM) 由来の胸骨で骨化不全が見られた。この胸骨骨化不全は LPM あるいは腱細胞系譜特異的 Ebf3 欠損でも確認でき、さらに LPM で発現する Ebf3 が Runx2 <sup>+</sup> 骨芽前駆細胞の産生に関与することが見出された。時期特異的 Ebf3 欠損により、胸骨形成における Ebf3 の機能時期が E10.5 前後であることを特定し、その時期の Ebf3 KO・ヘテロ胚の胸部 LPM での遺伝子発現の比較により、Ebf3 KO 胚での Runx2 上流制御因子 Shox2 や Islet1 などの未分化間葉細胞マーカー遺伝子の発現上昇、Islet1 陽性細胞数の増加などが見出された。			
以上より、Ebf3 が未分化 LPM 間葉細胞の分化制御を介して胸骨骨芽前駆細胞の産生・胸骨骨化に関与することが明らかになった。			
以上の研究は、発生における運動器間質細胞の新たな分化制御機構解明に貢献し、LPM に由来する骨の形成不全発症機構の理解などにつながる。			
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。			
なお、本学位授与申請者は、令和2年4月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降			